

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a. Main
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff)

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an der im
Parabioseversuch "übertragenen" experimentellen
Glomerulonephritis der Ratte

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Irmgard Mosler
aus Beuthen O/S

1961

1962



Dekan: Prof. Dr. med. K. Herzberg

Referent: Prof. Dr. med. E.F. Pfeiffer

Korreferent: Prof. Dr. med. Frey

Mündliche Prüfung: 22. Januar 1962

INHALTSVERZEICHNIS.	Seite
I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	4
II. HISTORISCHES ZUR METHODIK DER ANTIGEN- UND ANTI-KÖRPERMARKIERUNG	5
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	11
A. METHODIK	11
1. Gewinnung des nephrotoxischen Serums	11
2. Eiweißbestimmung im Urin	11
3. Parabioseoperation	12
4. Entbluten der Tiere	12
5. Gefrierschnitte	13
6. Färbung der Schnitte zum Nachweis von Kaninchen-Antikörpern gegen Rattenniere	13
7. Färbung der Schnitte zum Nachweis von autogenem Ratten γ -Globulin	14
8. Fluoreszenzmikroskopie	14
9. Photographische Aufnahmen	15
10. Histologische Untersuchungen	15
B. VERSUCHSANORDNUNG	15
1. Untersuchungen zum Nachweis von Kaninchen-AK	15
2. Untersuchungen zum Nachweis von autogenem γ -Globulin	16
C. ERGEBNISSE	16
1. Darstellung von Kaninchen-AK	16
a. Einzeltiere	16
b. Parabiosen	18
2. Darstellung von autogenem γ -Globulin	23
D. DISKUSSION	24
1. Kaninchen-Anti-Rattennieren-Globulin	24
2. Autogenes Ratten- γ -Globulin	28
E. ZUSAMMENFASSUNG	32
LITERATUR	34
LEBENS LAUF	40

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.

Nachdem Pfeiffer und Mitarbeiter (1,2,3,4) die "Übertragbarkeit" der experimentellen Glomerulonephritis (=Masugi-Nephritis) von einer kranken auf eine gesunde Ratte mit Hilfe der kontinuierlichen Vereinigung der Parabiose nachgewiesen hatten, war es notwendig, die Aufklärung des immunologischen Mechanismus zu versuchen. Zwei mögliche Ursachen der "Übertragungsreaktion" wurden von dieser Arbeitsgruppe diskutiert: 1. Schädigung der Niere des primär gesunden Parabionten durch nicht abgeundenes Kaninchennephrotoxin, das zur Zeit der Parabioseoperation noch in der nephritischen Ratte zirkulierte und über die Kapillarbrücke den Kreislauf und damit die Nieren des angehängten Tieres erreichte. 2. Entwicklung der Nierenläsion in der primär gesunden Ratte durch "sekundär nach Manifestation der Nephrotoxinnephritis entstehende gewebsschädigende Faktoren von hoher Spezifität" (2,4), die sich im primär kranken Parabionten gegen seine kranken Nieren gebildet hatten, über die Parabiosebrücke in das gesunde Tier hinüberwechselten und in dessen Nieren zu einer entzündlichen Reaktion führten.

Weitere Untersuchungen schienen eine Beteiligung heterologer Antikörper vom Kaninchen an der Entstehung der Nephritis in der angehängten Ratte auszuschließen oder zumindest unwahrscheinlich zu machen, da die Erkrankung selbst dann auftrat, wenn zwischen Nephrotoxininjektion in das Primärtier und Parabioseoperation Zeiträume bis zu 70 Tagen lagen (4), während das injizierte Kaninchen-Antiserum - Bestimmung der Eliminationsgeschwindigkeit mit Hilfe der Immunelektrophorese durch Pfeiffer und Mitarbeiter (5) und Ditschuneit und Mitarbeiter (6) - schon nach spätestens 10 Tagen nur noch in Spuren im Blutserum des primär nephritischen Tieres aufgefunden werden konnte.

Zur Bestätigung dieses Befundes wird in der vorliegenden Arbeit - unter Verwendung eines markierten Antikörpers gegen Kaninchenglobulin - der Versuch unternommen, die Anwesenheit der gegen Rattennieren gerichteten Kaninchenglobuline in den Nieren des primär kranken Tieres, ihr Fehlen in den Nieren der primär gesunden Ratte nachzuweisen.

Mit Hilfe eines markierten Antikörpers gegen Rattenglobuline

versuchten wir ferner, in den Nieren beider Parabionten auto-
genes Gamma-Globulin darzustellen. Wir setzen dabei voraus, daß
es sich bei jenen "nach Ausbruch der Nephrotoxinnephritis im
Primärtier entstehenden nierenschädigenden Stoffen", die Pfeiffer
und Mitarbeiter in den oben zitierten Arbeiten als mögliche Ur-
sache der "Übertragbarkeit" der Masugi-Nephritis zur Diskussion
stellen, um Ratten-Gamma-Globuline handelt.

II. HISTORISCHES ZUR METHODIK DER ANTIGEN-UND ANTIKÖRPERMAR- KIERUNG.

Die ersten Versuche, Antigene oder Antikörper zu markieren, um
ihren Weg im tierischen Organismus verfolgen zu können, liegen
noch nicht lange zurück.

Obermayer und Pick (7) verwendeten im Jahre 1906 diazotiertes
Rinderserum als Antigen mit dem Hinweis, daß dieses Eiweiß durch
Einführung der N=N Gruppe die Fähigkeit gewonnen habe, mit Pheno-
len und Aminen "schönfarbige Verbindungen" zu bilden. Die Autoren
interessierte an diesem diazotierten Antigen jedoch in erster
Linie seine Eigenschaft, Immunseren zu erzeugen, deren Antikör-
per die Artspezifität verloren hatten. Landsteiner (8) immuni-
sierte Kaninchen mit farbigen Azoproteinen aus Pferdeserum als
Antigen, um die "Abhängigkeit der serologischen Spezifität von
der chemischen Struktur" zu studieren und fand, daß die entste-
henden Antikörper spezifisch auf die Azokomponente des Antigens
eingestellt waren.

Erst in den 30iger Jahren wurden von Haurowitz und Breinl (9) -
gestützt auf die Erfahrungen Landsteiners mit Azoproteinen -
Antigene chemisch markiert mit der Absicht, "das Schicksal des
Antigens im Organismus zu verfolgen". Sie kuppelten das Antigen -
auch hier Pferdeserum - mit diazotierter Arsanilsäure (p-Amino-
Phenyl-Arsinsäure) und injizierten die Substanz Kaninchen. Zu
verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion wurden die Tiere ge-
tötet und der Arsengehalt der Organe bestimmt. Die Autoren
konnten auf diese Art feststellen, daß das Antigen innerhalb
weniger Stunden aus dem Blut verschwand und hauptsächlich von
Leber, Milz, Knochenmark und Niere abgefangen wurde.

Die chemische Markierung der Antigene erwies sich auch in

anderer Hinsicht als nützlich: es ließ sich das Verhältnis von Antigen zu Gesamtprotein im Antigen-Antikörper Präzipitat errechnen durch Ermittlung des N-Gehaltes des Präzipitates und kolorimetrische Bestimmung des farbigen Antigens (Marrack und Smith, 10). Um genaue Ergebnisse zu bekommen, mußte der an das Antigen gebundene Farbstoff besonders intensiv sein. Heidelberger, Kendall und Soo Hoo (11) führten deshalb das diazotierte Benzidin-azo-R Salz (R Salz = Natriumsalz der β -Naphthol-4-Disulfosäure) als Farbstoff in die Immunologie ein, das sie an Ovalbumin kuppelten und damit ein tiefrot gefärbtes Antigen erhielten. Sabin (12) injizierte Kaninchen die gleiche Substanz, um die Lokalisation des Antigens in vivo nachzuweisen. Sie konnte das rote Antigen unter dem Mikroskop in Zellen des RES wiederfinden und schloß daraus, daß dies auch die Orte der Antikörperbildung sein mußten.

Bei Markierungen von Antikörpern mit einfachen chemischen Verbindungen kam es darauf an, die spezifische Reaktionsfähigkeit des Antikörpers mit dem homologen Antigen zu erhalten. Reiner (13), Bronfenbrenner (14) und Marrack (15) kuppelten Antikörper mit Diazoverbindungen und konnten die zu einem hohen Grade erhaltene immunologische Spezifität chemisch veränderter Antikörper nachweisen. Eagle und Mitarbeiter (16) weisen allerdings darauf hin, daß Antikörper durch genügend starke Kuppelung schließlich doch inaktiviert würden und zwar verschiedene Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten. Obwohl es Marrack (15) (unter Verwendung des diazotierten Benzidin-azo-R Salzes Heidelbergers, Kendalls und Soo Hoos als Antikörpermarkierung) gelungen war, mit R-Salz-azo-Benzidin-azo-Antityphusserum homologe Erreger spezifisch zu agglutinieren - unter Rotfärbung des Agglutinats - war doch diese Kennzeichnung eines Antikörpers noch nicht ideal zu nennen, da trotz der Einführung der zahlreichen chemischen Gruppen in das Antikörpermolekül die Intensität der Rotfärbung des Erreger-Antikörperkomplexes für mikroskopische Untersuchungen nicht ausreichte (Coons und Mitarbeiter, 17). Diese Autoren beschritten deshalb einen völlig neuen Weg, der sich späterhin als brauchbar für die verschiedensten Problemstellungen erwies.

Fieser und Creech (18) und Creech und Jones (19) hatten hierzu

die Vorarbeit geleistet. Sie stellten Verbindungen von Proteinen mit den Isocyanaten polynukleärer aromatischer Kohlenwasserstoffe her, um ihre cancerogenen Eigenschaften zu prüfen. Die Verbindungen zeigten starke Fluoreszenz. Coons und Mitarbeiter begannen sich dieser Stoffe zu bedienen, nachdem sich gezeigt hatte, daß sie - an Antikörper gekuppelt - diese nicht hindern, mit dem homologen Antigen spezifisch zu reagieren. Sie arbeiteten zunächst mit dem Isocyanat des Anthracens (17), das für die Behandlung von Gewebsschnitten ungeeignet war, da sich seine blaue Fluoreszenz von der Autofluoreszenz der Gewebe zu wenig unterscheidet. Schließlich ermittelten die gleichen Autoren (20,21, 22) Fluoreszein-Isocyanat als geeignet zur Antikörpermarkierung, da es sowohl den Antikörpertiter des Antiserums als auch die Aktivität der Antikörper nicht wesentlich beeinflußt und unter dem Fluoreszenzmikroskop an den Orten von Antigen-Fluoreszeinantikörper-Niederschlag eine strahlend gelb-grüne Fluoreszenz ergibt. Diese Farbe kommt als Eigenfluoreszenz im Säugetiergewebe nicht vor (Hamperl, 23).

Zahlreiche Arbeiten folgten nun auf dem Gebiet der Antigendarstellung durch fluoreszierende Antikörper; alle aufzuzählen würde zu weit führen. Auf das Prinzip der direkten und indirekten Antigendarstellung in vitro nach Coons und Mitarbeitern und die Modifikation dieser Methode zur indirekten Antigendarstellung in vivo nach Mellors mit fluoreszierenden Antikörpern soll jedoch näher eingegangen werden, da die vorliegende Arbeit mit der Mellors'schen Modifikation der Fluoreszenztechnik ausgeführt wurde.

Coons und Mitarbeiter (20,21,22) injizieren ein Antigen, stellen Gefrierschnitte der verschiedenen Organe her, lassen den homologen, mit Fluoreszein-Isocyanat gefärbten Antikörper einwirken und erhalten an den Orten spezifischer Antigen-Antikörperreaktion Fluoreszenz (=direkter Antigennachweis). Die Antikörperherstellung erfolgt durch Sensibilisierung eines "Spendertieres" gegen das nachzuweisende Antigen.

Zur Darstellung zellständiger Antikörper entwickelten Coons und Mitarbeiter (24, 25, 26) die "Sandwichmethode", eine Erweiterung ihrer ursprünglichen Technik. Ein Gefrierschnitt, der

zellständige Antikörper enthält, wird zweimal überschichtet: zunächst mit ungefärbtem homologem Antigen, das sich an den Stellen der Antikörperlokalisation niederschlägt und anschließend mit markiertem Antikörper, um die Antigenorte und damit die zellständigen Antikörper im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Durch direkte Markierung des Antigens können die zellständigen Antikörper zwar auch lokalisiert werden, die Methode ist jedoch ziemlich unempfindlich, da Antigene eine größere Anzahl von immunologisch wirksamen Gruppen besitzen als Antikörper, d.h. verhältnismäßig geringe Mengen des markierten Antigens zahlreiche Antikörpermoleküle binden, und somit nur eine unbedeutende Fluoreszenz erreicht wird (25). Bei der Verwendung der 2-Schichten-Technik bewirkt diese Eigenschaft des Antigens dagegen eine erhebliche Steigerung der Empfindlichkeit.

Die Sandwichmethode fand ferner Verwendung (Weller und Coons, 27) zum Nachweis unmarkierter spezifischer Antikörper - in vitro an einem Antigenort präzipitiert - mit markiertem Antiglobulin. Es werden zum Beispiel mit einem bestimmten Virusstamm beimpfte Zellkulturen (Antigen) mit Rekonvaleszentenserum überschichtet und die präzipitierten Antikörper des Rekonvaleszenten-serums mit fluoreszierenden Antikörpern gegen menschliches Gamma-Globulin dargestellt. Interessant ist hier die doppelte Funktion des Rekonvaleszentenserums, das auf einer Seite der Schicht als Antikörper, auf der anderen Seite als Antigen reagiert.

Die modifizierte "Sandwichmethode" nach Mellors (28) dient dem Nachweis antigener Komponenten in Geweben, insbesondere in den Nierenglomerula und bietet den Vorteil der Lokalisation von Antikörpern "in vivo".

Mellors verbindet dabei die Coons'sche Methode mit der experimentellen Glomerulonephritis. Er injiziert einem Kaninchen Rattennierenbrei. Das Anti-Rattennieren-Antikörper enthaltende Kaninchenserum wird einer gesunden Ratte gespritzt. Es kommt in der Rattenniere zur Gewebsantigen (Rattenniere)-Antikörper (Kaninchenglobulin) Reaktion, die Mellors nun sichtbar macht. Dazu wird eine 3. Tierart - Huhn oder Schaf - gegen Kaninchenglobulin, das hier als Antigen wirkt, sensibilisiert und damit die Bildung von Antikörpern gegen Kaninchenglobulin angeregt. Dieser

Anti-Antikörper wird mit Fluoreszein-Isocyanat gekuppelt und auf einen Gefrierschnitt der Kaninchenglobulin enthaltenden Ratteniere gebracht. An den Orten der Kaninchenglobulinlokalisation schlägt sich der fluoreszierende Antikörper nieder, erzeugt Fluoreszenz und dient somit der Wiederauffindung des injizierten Antikörpers, markiert aber gleichzeitig die Orte, an denen Antigene sitzen, die den injizierten Antikörper adsorbiert haben (indirekter Antigennachweis in vivo nach der Sandwichmethode).

Eine Gegenüberstellung der Coons'schen Methode (Coons und Mitarbeiter) und der Mellors'schen Modifikation dieser Methode zeigt Abb. 1, während Abb. 2 die Versuchsanordnung nach Mellors kurz skizziert.

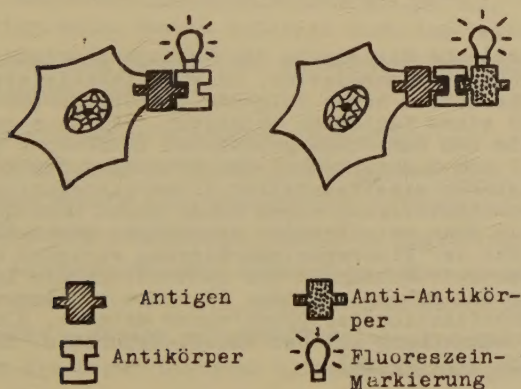


Abb. 1. Schema zur Erläuterung der Coons'schen Methode (Coons und Mitarbeiter) links und der Modifikation dieser Methode nach Mellors rechts.

Coons weist das injizierte Antigen durch den entsprechenden markierten Antikörper, den er auf einen Gefrierschnitt des Antigen enthaltenden Gewebes bringt, nach.

Mellors injiziert den unmarkierten Antikörper eines Gewebsantigens, der sich in vivo lokalisiert und dann auf einem Gefrierschnitt mit einem fluoreszierenden Anti-Antikörper dargestellt wird. (Abgeändert nach Mellors, 28)

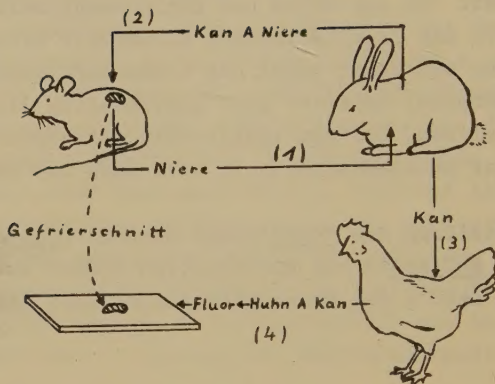


Abb. 2. Schematische Wiedergabe der Versuchsanordnung nach Mellors zum Nachweis unmarkierter, in vivo lokalisierender Antikörper. Die Zahlen haben folgende Bedeutung: (1) Rattennierenbrei wird einem Kaninchen injiziert. (2) Eine gesunde Ratte erhält die vom Kaninchen gebildeten Antikörper gegen Rattenniere. (1 und 2 entsprechen der Erzeugung der von Masugi zuerst beschriebenen experimentellen Glomerulonephritis der Ratte). (3) Sensibilisierung eines Huhns gegen Kaninchenglobuline. (4) Die im Huhn entstehenden Antikörper gegen Kaninchen-eiweiß werden mit der Fluoreszeinmarkierung versehen und kennzeichnen auf dem Gefrierschnitt der Rattenniere die Lokalisationspunkte der Kaninchenglobuline. (3 und 4 stellen die Mellors'sche Modifikation der Coons'schen Methode, d.h. ihre Anwendung im Zusammenhang mit der Masugi-Nephritis, dar). (Abgeändert nach Mellors, 28)

Pressman (29) beschreibt - aufbauend auf den Coons'schen Arbeiten - eine Methode des direkten Antigennachweises in vivo. Er injiziert der Ratte den bereits markierten, gegen Rattennieren gerichteten Antikörper vom Kaninchen und läßt ihn in vivo lokalisieren. Nach seinen Erfahrungen ist diese Methode mit zwei Nachteilen belastet: 1. starke unspezifische Fluoreszenz in der Leber, 2. 4-12mal größere Antikörpermengen sind notwendig, um eine der Mellors'schen Methode vergleichbare Fluoreszenz zu erhalten.

Zusammengefaßt ergeben sich 4 Methoden des Antigen- bzw. Antikörpernachweises mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern:

1. Direkter Antigennachweis nach Coons (in vitro)
2. "Sandwichmethode" nach Coons:
 - a. Indirekter Antikörpernachweis (in vitro)
 - b. Indirekter Antigennachweis (in vitro)
3. Modifizierte "Sandwichmethode" nach Mellors - Indirekter Antigennachweis mit Antikörperlokalisation in vivo.
4. Direkter Antigennachweis nach Pressman (in vivo)

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.

A. METHODIK:

1. Gewinnung des nephrotoxischen Serums. Die Herstellung des nephrotoxischen Serums erfolgte nach dem Verfahren von Masugi (30,31) und Smadel (32) in der Modifikation von Pfeiffer und Mitarbeitern (33).

5 Kaninchen mit einem Durchschnittsgewicht von 2,5 bis 3,5 kg erhielten während eines Monats 3 mal wöchentlich, während der nächsten zwei Monate 2mal wöchentlich Injektionen von je 2 ml einer 20%igen Rattennierensuspension in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal. Jedes Tier bekam insgesamt 18 bis 26 Injektionen - von der 12. Injektion an wurde der Titeranstieg getestet - danach erfolgte Entblutung durch Herzpunktion. Wir prüften die nephrotoxische Wirksamkeit der gewonnenen Seren an jeweils zwei Ratten, die wir nach Injektion der Rattennieren-Antikörper klinisch und histologisch untersuchten. Die Seren wurden auf 56° erhitzt und bei -20° aufbewahrt.

2. Eiweißbestimmungen im Urin. Die quantitative Eiweißbestimmung im Urin wurde nach der Methode von Böhle und Fischer (34) durchgeführt. Zu 1 ml Sammelurin wurden 3 ml physiologische Kochsalzlösung und 2 ml Amidoschwarz hinzugefügt, die Mischungen 1/2 Stunde stehen gelassen, dann mit 8000 Umdrehungen 15 Minuten zentrifugiert und 2 ml des Überstandes mit destilliertem Wasser auf 25 ml verdünnt. Die Lösung ist umso

heller, je mehr Eiweiß sich im Urin befindet. Die Farbdifferenz gegenüber einem Kontrollwert, der statt Urin physiologische Kochsalzlösung enthält, wurde mit einem Eppendorf Photometer - Filter 578 - bestimmt. Die Eiweißmenge wird in mg/ml angegeben. Der Eiweißgehalt einer normalen Ratte beträgt bis zu 0,15 mg/ml Urin.

3. Parabioseoperation. Zur parabiotischen Vereinigung verwendeten wir weibliche erbreine Albino-Wistar-Ratten aus langfristiger Bruder-Schwester Inzucht (Stamm Köln und Stamm Hannover) mit einem Durchschnittsgewicht von 100 - 120 gr. Die operative Vereinigung erfolgte nach der Methode von Bunster und Meyer (35) auf folgende Weise:

In Äthernarkose entfernten wir die Haare auf der linken bzw. der rechten Seite des Parabionten, legten einen Hautschnitt von der Ohrwurzel bis zum Beckenkamm und vernähten die beiden aneinandergelegten Schulterblätter mit Zwirn. Danach wurden die dorsalen Hautränder der beiden Tiere mit Klammern vereinigt und die Parabionten in Rückenlage gebracht. Nach Eröffnung der Bauchhöhlen durch einen 1 cm langen Schnitt, vernähten wir die vier Bauchdeckenränder mit Catgut, so daß eine breite Verbindung zwischen beiden Tieren entstand. Anschließend wurden die ventralen Hautränder geklammert und entlang der ganzen Parabiosehautnaht ein Zellstoffverband angelegt, um ein Verbeißen der Tiere zu verhindern.

Die Ratten erhielten vor und nach der Operation ausreichend Wasser und eine Standardkost bestehend aus Weizen, Weizenklee, Hafer, Mais, Gerste, Sonnenblumenkernen, Knochenschrot, Magermilchpulver, Fischmehl und Waldhof-Futterhefe mit Zusätzen von Vitaminen und anorganischen Salzen.

4. Entbluten der Tiere. Die Ratten wurden in Äthernarkose bei schlagendem Herzen mit physiologischer Kochsalzlösung von der Vena cava aus entblutet. Wir durchtrennten die Aorta oberhalb der bifurcatio aortae. Durchschnittlich verbrauchten wir 400 bis 500 ml Spüllösung, bis die Nieren blutleer waren. Der Gefäßstiel einer Niere wurde zuvor mit einer Arterienklemme aus dem Kreislauf ausgeschaltet. Diese Niere legten wir dann in 4%ige Formalinlösung. Die andere - durchspülte - Niere wurde

sofort in ein Kohlensäure-Aceton Gemisch gebracht, bis sie völlig gefroren war, anschließend in einer Tiefkühltruhe bei -20° bis zum Schneiden aufbewahrt oder sogleich geschnitten.

5. Gefrierschnitte. Zur Herstellung der Schnitte benutzen wir einen Linde-Kryostaten, der nach dem Prinzip von Linderström-Lang und Morgensen gebaut ist mit Verbesserungen von Dittes-Duspiwa. In der unteren Hälfte des Kryostaten befindet sich ein eingebaute Kühlsatz mit automatischer Temperaturkontrolle, in der oberen eine allseitig isolierte Kühlkammer - der "gekühlte Behälter" Linderström-Langs - in der das Mikrotom untergebracht ist. In der Kühlkammer herrscht aufgrund der technischen Einrichtungen eine gleichmäßige Temperatur von -23° . Auf jeder Seite des Apparates befindet sich eine Eintrittsöffnung für die Hände.

Die Gefrierschnitte sollen eine Schichtdicke von $4-7\mu$ nicht überschreiten. Sie werden mit einem Pinselchen auf einen Objektträger befördert, an den Rändern geglättet und durch Andrücken des Daumens an die Unterseite des Objektträgers aufgetaut. Anschließend wurden die Schnitte 1-2 Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet und danach im Kühlraum bis zum nächsten Tag aufbewahrt.

6. Färbung der Schnitte zum Nachweis von Kaninchen-Antikörpern gegen Rattenniere. Zwischen Herstellung der Schnitte und Färbung lag jeweils nur ein Tag, da sich bei längerem Aufbewahren der Schnitte die Autofluoreszenz störend bemerkbar machte. Die Färbetechnik ist folgende (Ortega und (36) Mellors): die Gefrierschnitte werden zunächst in Phosphatpuffer von pH 7 - bestehend aus primärem Natriumphosphat, sekundärem Kaliumphosphat und NaCl - 15 Minuten lang unter leichtem Schütteln und 3maligem Wechseln des Puffers gewaschen. Dadurch sollen die löslichen, nicht abgeburdenen Serumproteine vom Kaninchen entfernt werden. Anschließend wird der überschüssige Puffer mit Löschpapier vorsichtig um den Schnitt herum abgetupft und ein Tropfen markiertes Anti-Kaninchen-Schafserum auf den Schnitt gebracht. Nach einer Einwirkungsdauer von 45 Minuten, während der wir den Objektträger in einer geschlossenen Petrischale auf feuchtem Filtrierpapier aufbewahrten, spülten

wir 3mal je 2 Minuten lang mit Phosphatpuffer, um den überschüssigen Farbstoff des markierten Antikörpers zu entfernen. Anschließend wird der Schnitt vorsichtig getrocknet, mit einem Tropfen Glycerin-Phosphatpuffer Gemisch (9 Teile Glycerin, 1 Teil Phosphatpuffer) und einem dünnen Deckgläschen bedeckt, mit Bienenwachs versiegelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Wir verwendeten als fluoreszierenden Antikörper Schaf-Anti-Kaninchen Globulin, das mit Fluoreszein-Isothiocyanat markiert war (Sylvana Chemical Co, Orange, N.J.).

Zum Ausschluß unspezifischer Fluoreszenz wurden Kontrollschnitte mit fluoreszierendem Schaf-Anti-Kaninchen Globulin behandelt:

- a. Schnitte einer normalen Rattenniere,
- b. Nierenschnitte von Ratten, denen normales Kaninchen-serum injiziert worden war,
- c. Nierenschnitte von nephritischen Ratten nach vorausgehender Übersichtung mit nicht markiertem Schaf-Anti-Kaninchen Globulin.

7. Färbung der Schnitte zum Nachweis von autogenem Ratten Globulin. Färbetechnik und Kontrollschnitte wie in Abschnitt 6 beschrieben. Als markierter Antikörper diente fluoreszierendes Kaninchen-Anti-Ratten Globulin.

8. Fluoreszenzmikroskopie. Wir verwendeten ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss mit Dunkelfeldkondensor (23,26). Als Lichtquelle diente eine Quecksilberhöchstdrucklampe. Folgende Filterkombinationen erwiesen sich als günstig: Erregerfilter UG 5 zwischen Quecksilberlampe und Präparat mit einer spektralen Transmission kurzer Wellenlängen unterhalb 4200 Å, Sperrfilter BG 23 und GG 4 im Zwischentubus zwischen Präparat und Okular mit einer Durchlässigkeit für Wellenlängen zwischen 3700 und 6600 Å.

Pringsheim (37) gibt als Absorptionsgipfel des Fluoreszein 4940 Å an. Coons (26) empfiehlt Erregerfilter, deren Durchlässigkeit unterhalb dieser Wellenlänge liegt, um eine zu starke Absorption zu vermeiden. Nach Schiller und Mitarbeitern (38) zeigt Fluoreszein außer dem oben erwähnten noch weitere kleine Absorptionsgipfel bei 2400 Å und 2800 Å.

9. Photographische Aufnahmen. Photographische Aufnahmen wurden mit einer Leica auf Adox Film KB 14 gemacht. Es wurde durchschnittlich 30 bis 60", bei Verwendung des Dunkelfeldkondensors 240" belichtet.

10. Histologische Untersuchungen. Eine Niere eines jeden Tieres wurde vor Herstellung von Paraffinschnitten in Formalin gelegt; Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin.

B. VERSUCHSANORDNUNG.

1. Untersuchungen zum Nachweis von Kaninchen-Antikörpern. Wir untersuchten Einzeltiere und Parabiosen, die wir jeweils in 4 Gruppen unterteilten:

Gruppe I: Die Tiere erhielten eine kleine Dosis nephrotoxischen Serums (0,8 bzw. 1 ml). Zwischen Injektion und Tod (Einzeltiere) bzw. Injektion und Parabiose lagen 4 Tage. Diese Gruppe trägt die Bezeichnung: Kleine Dosis - Kurzes Intervall (K.D.K.I.).

Gruppe II: Die Ratten dieser Gruppe bekamen ebenfalls eine kleine Dosis Kaninchen-Antiserum: 0,8-1 ml. Das Intervall zwischen Injektion und Tod bzw. Injektion und Parabiose betrug 31 bis 33 Tage. Kurzbezeichnung für diese Gruppe: Kleine Dosis - Langes Intervall (K.D.L.I.).

Gruppe III: Es wurde eine große Dosis von 4 ml Nephrotoxin an drei aufeinanderfolgenden Tagen injiziert. Das Intervall betrug 5 bis 8 Tage. Abkürzung für diese Gruppe: G.D.K.I. (Große Dosis - Kurzes Intervall).

Gruppe IV: Die letzte Gruppe erhielt eine große Dosis von 4 ml an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Das Intervall war 21 bis 55 Tage. Gruppenbezeichnung: G.D.L.I. (Große Dosis - Langes Intervall).

Die für die Parabioseoperation vorgesehenen Tiere aus diesen 4 Gruppen wurden nach den oben angegebenen Zeitabschnitten mit einem primär gesunden Tier vereinigt, wenn wir bei wiederholten Urinuntersuchungen mehr als 0,2 mg Eiweiß pro ml Urin gefunden hatten. Der nephritiskranke Parabiont trägt im folgenden die Bezeichnung A-Tier, der primär gesunde Partner B-Tier.

2. Untersuchungen zum Nachweis von autogenem γ -Globulin.

Die Versuche zum Nachweis autogener Ratten- γ -Globuline waren ursprünglich an den gleichen Parabionten geplant, die wir in Abschnitt 1 verwendeten. Durch ein technisches Versehen (Unterbrechung der elektrischen Stromzufuhr der Tiefkühltruhe) taute das gesamte Material auf und konnte nicht mehr verwendet werden. Es wurden 7 neue Parabiosen angesetzt, von denen nur 3 überlebten.

Die A-Tiere erhielten 0,6 ml Kaninchennephrotoxin. Die Parabioseoperation erfolgte nach 18 Tagen. 3 Wochen post operationem wurden die Ratten in Narkose mit physiologischer Kochsalzlösung von der Vena cava aus entblutet. Hier mußte die Durchspülung sehr sorgfältig durchgeführt werden, um das Rattenserum - d.h. Ratten-Globulin - möglichst vollständig aus den Nieren herauszuwaschen.

C. ERGEBNISSE.

1. Darstellung von Kaninchen-Antikörpern.

a. Einzeltiere: In allen vier Gruppen konnte spezifische Fluoreszenz der Basalmembran der Glomerula nachgewiesen werden. Die Kaninchennephrotoxine hatten sich also an der Basalmembran abgesiedelt.

Starke Fluoreszenz zeigten die Tiere 6 und 7 der Gruppe III und Tier 9 der Gruppe IV - Tier 8 der IV. Gruppe war entgegen unseren Erwartungen negativ - die je 4 ml Kaninchen-Antiserum erhalten hatten. Obwohl diese Menge auf 3 Portionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen verteilt worden war, starben drei weitere Tiere nach der 2. Injektion.

Die Gruppen mit den kleinen Nephrotoxinmengen (I und II) hatten schwächere Befunde. Tier 1 der I. Gruppe war negativ. Bei Tier 2 der I. Gruppe waren die Fluoreszenzerscheinungen mäßig, bei Tier 3 und 5 der II. Gruppe schon intensiver. Bemerkenswert sind die Eiweißbefunde, die in keiner sicheren Beziehung zur injizierten Nephrotoxinmenge oder zum Antikörpernachweis stehen. Die histologischen Veränderungen waren teils geringer Natur mit herdförmigen Schwellungen der Glomerulumzellen, teilweise sehr ausgeprägt mit deutlicher Vermehrung der glomerulären Deck- und Endothelzellen und Verwachsungen der Schlingen.

Sämtliche Einzelergebnisse finden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1. Zusammenfassende Darstellung der klinischen, histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Befunde von 9 Einzeltieren.

Nr.	Dosis in ml	Dauer der Nephrotoxin- einwirkung	Protein- urie mg/ml	Histol. Befunde	Fluoreszenz- mikroskop. Befunde
<u>I. Gruppe:</u>					
1.	0,8	4 Tage	0,08	1	Ø
2.	0,8	4 Tage	1,36	2	(+)
<u>II. Gruppe:</u>					
3.	0,8	31 Tage	1,23	2	++
4.	0,8	31 Tage	0,50	3	(+)
5.	0,8	31 Tage	0,25	2	+
<u>III. Gruppe:</u>					
6.	4,0	8 Tage	0,30	2	++
7.	4,0	8 Tage	0,26	2	+++
<u>IV. Gruppe:</u>					
8.	4,0	55 Tage	1,12	3	Ø
9.	4,0	21 Tage	1,30	3	+++

Anmerkungen: Die Intensitätsunterschiede der fluoreszierenden Glomerula wurden geschätzt.

Die histologischen Nierenveränderungen sind in Stärkegraden angegeben:

Stärke 1: Geringe, vorwiegend herdförmige Schwellung der Glomerulumzellen, keine Zellvermehrung und Schlingenverklebung, Grundmembranen unverändert.

Stärke 2: Intracapilläre Glomerulonephritis mit Verquellung der Grundmembranen, geringer Vergrößerung und deutlicher Vermehrung der Endothelzellen; hyalintropfige Einschlüsse in den Hauptstückepithelien.

Stärke 3: Ausgeprägte, intracapilläre Glomerulonephritis mit starker Schwellung und deutlicher Vermehrung der glomerulären Deck- und Endothelzellen; Verwachsungen der Schlingen; hyalintropfige Eiweißspeicherung in den Tubulusepithelien.

b. Parabiosen: Von 29 Parabiosen konnten nur 15 verwertet werden, da 14 Paare innerhalb der ersten Tage post operationem starben. Die größten Verluste traten bei den Parabiosen der III. und IV. Gruppe auf, deren A-Tiere 4 ml Nephrotoxin erhalten hatten. Es war kaum möglich, diese schwer nephritischen Tiere länger als 12 Tage am Leben zu halten.

Unsere Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen: (A-Tier = nephritisches Tier, B-Tier = primär gesunder Partner)

I. Gruppe: Das A-Tier der Parabiose I hatte einen hohen Eiweißwert (1,72 mg/ml Urin), zeigte aber nur mäßige Fluoreszenz der Basalmembranen der Glomerula. Im B-Tier war keine spezifische sondern nur unspezifische Fluoreszenz der Gefäße und Tubuli nachzuweisen. Bei dem A-Tier der Parabiose 2 betrug der Eiweißwert 0,56 mg/ml Urin, die Fluoreszenzerscheinungen an den Glomerula dagegen waren deutlicher. Das B-Tier bot keine spezifische Fluoreszenz.

II. Gruppe: Hier war es uns gelungen, 8 Parabiosen bis zu 18 bzw. 24 Tagen am Leben zu erhalten. Drei der acht A-Tiere (A 3, A 7, A 8) zeigten keinerlei Fluoreszenz in den Basalmembranen der Glomerulumschlingen. Bei drei Parabiosen boten die A-Tiere (A 4, A 9, A 10) stark fluoreszierende Glomerula. Hier waren auch die Eiweißwerte mit 0,88 mg/ml, 0,90 mg/ml und 0,62 mg/ml Urin relativ hoch. Alle B-Tiere waren ohne Fluoreszenz. Die Fluoreszenz in den A-Tieren der zwei restlichen Parabiosen dieser Gruppe (A 5 und A 6) war mäßig bei niedrigem Eiweißbefund (0,26 und 0,48 mg/ml Urin); B-Tiere auch hier negativ.

III. Gruppe: Von den 3 verwertbaren Parabiosen dieser Gruppe (P 11, P 12, P 13) zeigten alle A-Tiere eine ausgezeichnete Fluoreszenz. Die Urinuntersuchungen ergaben Eiweißwerte von 0,36 mg/ml bis 1,64 mg/ml Urin. Die B-Tiere boten wiederum keine spezifische Fluoreszenz der Glomerula.

Abb. 3a zeigt ein Glomerulum des A-Tieres der Parabiose 11 aus dieser Gruppe, Abb. 3b ein Glomerulum des B-Tieres des gleichen Paares. Während das Glomerulum des nephritischen Tieres aufleuchtet, ist der Glomerulumbereich des primär gesunden Partners dunkler als die Umgebung.

Für Abb. 4a und 4b - Nierenschnitte der gleichen Parabionten - wurde ein schwächeres Objektiv verwendet.

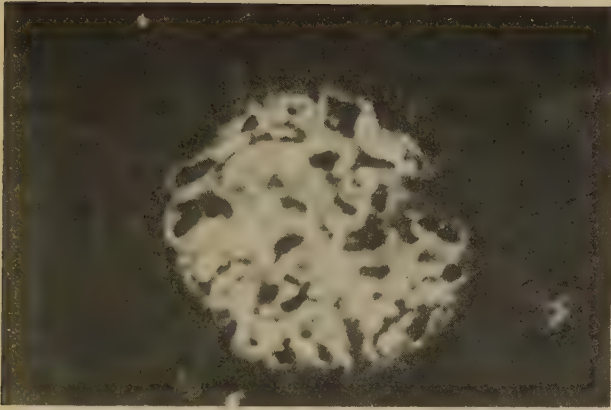


Abb. 3a. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Kaninchen-Globuline (Nephrotoxine) in den Glomerula der primär nephritischen Ratte mit Hilfe eines markierten Anti-Kaninchen-Globulins vom Schaf. Spezifische Fluoreszenz in den Glomerulumschlingen. (Vergrößerung 10 x 40)

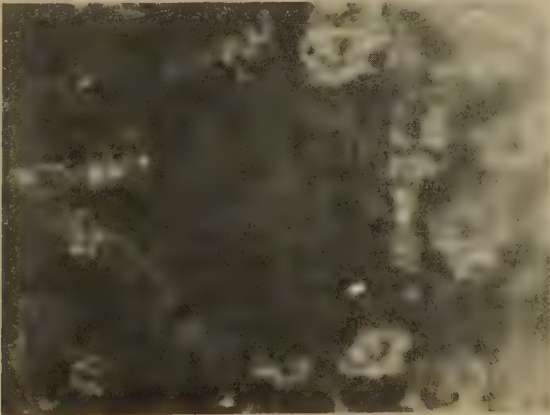


Abb. 3b. Versuch der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Kaninchen-Globuline in den Glomerula des primär gesunden Parabionten mit Hilfe eines markierten Anti-Kaninchen-Globulins vom Schaf. Keine spezifische Fluoreszenz im Glomerulum, nur unspezifische Fluoreszenz in Tubuli und Interstitium. (Vergrößerung 10 x 40)

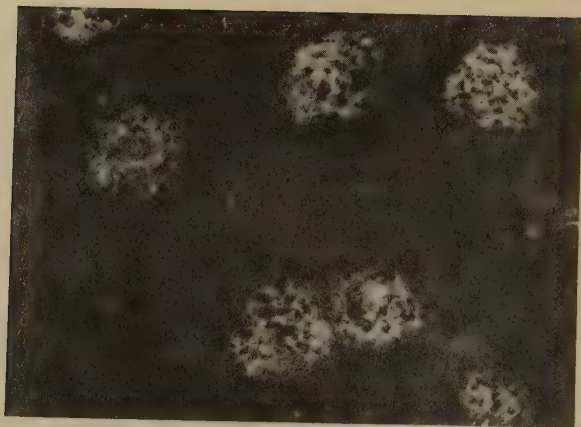


Abb. 4a entspricht Abb. 3a; Vergrößerung 10 x 16.



Abb. 4b entspricht Abb. 3b; Vergrößerung 10 x 16.

IV. Gruppe: Hier konnten wir nur 2 Parabiosen (P14 und P 15) am Leben halten. Die Eiweißwerte waren hoch und zwar 1,01 mg/ml Urin für das A-Tier von P 14, 1,39 mg/ml Urin für das A-Tier von P 15. A 14 zeigte eine gute Fluoreszenz, A 15 dagegen nur ein mäßiges Aufleuchten der Glomerula. Die B-Tiere waren negativ.

Das histologisch nachweisbare Ausmaß der Nierenentzündung der Parabiosen war schwächer ausgeprägt als bei den früheren Untersuchungen von Pfeiffer und Mitarbeitern (2,3,4).

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Parabiosen zusammengefaßt.

Wir untersuchten weiterhin zum Ausschluß einer unspezifischen Fluoreszenz zwei Kontrollparabiosen, die kein Nephrotoxin erhalten hatten und zwei Parabiosen, bei denen den A-Tieren normales Kaninchenserum injiziert worden war. Wir konnten bei diesen acht Ratten keine fluoreszierenden Glomerula finden.

Außerdem waren Nierenschnitte von den A-Tieren der Parabiosen 9, 10 (II. Gruppe) und der Parabiosen 11, 12 (III. Gruppe) - vor Überschichtung mit dem fluoreszierenden Antikörper - mit dem gleichen, nicht markierten Antikörper (Schaf-Anti-Kaninchen-Globulin ohne Fluoreszein-Isothiocyanat) vorbehandelt worden. Auf diesen Schnitten blieben die Glomerula dunkel, die unspezifische Fluoreszenz der Tubuli und Gefäßendothelien dagegen war unverändert stark.

Tabelle 2. Zusammenfassende Darstellung der klinischen, histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Befunde von 15 Parabiosen.

Nr.	Dosis in ml	Intervall zw. Inj. u. Parab.	Dauer der Parab.	Protein- urie mg/ml A-Tier'	Histolog. Befunde		Fluoreszenz- mikrosk.Bef.	
				A-Tier	B-Tier	A-Tier	B-Tier	
<u>I. Gruppe:</u>								
1.	0,8	4 Tage	10 Tage	1,72	1	1	(+)	Ø
2.	1,0	4 Tage	10 Tage	0,56	2	1	+	Ø
<u>II. Gruppe:</u>								
3.	0,8	33 Tage	24 Tage	0,26	2	1	Ø	Ø
4.	0,8	32 Tage	18 Tage	0,88	2	2	++	Ø
5.	0,8	33 Tage	23 Tage	0,48	2	1	(+)	Ø
6.	0,8	33 Tage	23 Tage	0,26	2	1	(+)	Ø
7.	1,0	33 Tage	22 Tage	0,51	2	2	Ø	Ø
8.	1,0	31 Tage	18 Tage	0,41	2	3	Ø	Ø
9.	1,0	33 Tage	22 Tage	0,90	2	2	++	Ø
10.	1,0	33 Tage	22 Tage	0,62	1	1	++	Ø
<u>III. Gruppe:</u>								
11.	4,0	6 Tage	7 Tage	0,36	3	2	+++	Ø
12.	4,0	5 Tage	12 Tage	1,64	3	2	+++	Ø
13.	4,0	7 Tage	7 Tage	0,48	2	1-2	++	Ø
<u>IV. Gruppe:</u>								
14.	4,0	42 Tage	10 Tage	1,01	2	2	+(+)	Ø
15.	4,0	53 Tage	8 Tage	1,39	3	2	(+)	Ø

Anmerkungen:

' A-Tier = primär nierenkrankes Tier
B-Tier = primär gesundes Tier

Die Intensitätsunterschiede der fluoreszierenden Glomerula wurden geschätzt.

Die Einteilung der histologischen Befunde erfolgte nach Stärkegraden 1-3. Beschreibung der Stärkegrade siehe Tabelle 1.

2. Darstellung von autogenem γ -Globulin. Die A-Tiere der drei Überlebenden Parabiosen hatten Eiweißwerte zwischen 0,35 und 1,03 mg/ml Urin. Die Nierenschnitte dieser sechs Ratten wurden zur Hälfte mit markiertem Schaf-Anti-Kaninchen-Globulin, zur Hälfte mit markiertem Kaninchen-Anti-Ratten-Globulin behandelt. Alle drei A-Tiere zeigten trotz der geringen Dosen injizierten Nephrotoxins (0,6 ml) starke Fluoreszenz in den mit Schaf-Anti-Kaninchen-Globulin behandelten Schnitten. In den B-Tieren waren keine Kaninchenantikörper-Globuline nachzuweisen, die Glomerula blieben dunkel.

Auch bei der Behandlung der Schnitte mit markiertem Kaninchen-Anti-Ratten-Globulin konnten wir zwar in den A-Tieren deutliche Fluoreszenz feststellen, die B-Tiere unterschieden sich jedoch nicht von den Kontrollen, d.h. in den Glomerula der A-Tiere hatte sich autogenes γ -Globulin abgesiedelt, in den B-Tieren nicht.

Eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse dieser drei Parabiosen gibt Tabelle 3.

Tabelle 3. Zusammenfassende Darstellung der klinischen und fluoreszenzmikroskopischen Befunde von 3 Parabiosen.

Nr.	Dosis in ml	Intervall zwischen Injektion u. Parab.	Dauer der Para- biose	Protein- urie mg/ml A-Tier'	Fluoreszenzmikrosk. Befunde bei Behandlung d.Nieren mit			
					Schaf-Anti- Kaninch.Glob.	Kaninch-Anti- Rat.-Glob.	A-Tier	B-Tier
1.	0,6	18 Tage	21 Tage	0,78	++	Ø	++	Ø
2.	0,6	18 Tage	21 Tage	1,03	+++	Ø	++	Ø
3.	0,6	18 Tage	21 Tage	0,35	++	Ø	+(+)	Ø

Anmerkungen:

' A-Tier = primär nierenkrankes Tier

B-Tier = primär gesundes Tier

Die Intensitätsunterschiede der fluoreszierenden Glomerula wurden geschätzt.

D. DISKUSSION.

1. Kaninchen-Anti-Rattennieren-Globulin.

Die Untersuchungen an Einzeltieren waren notwendig, um die Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzmethode zu studieren. So fiel auf, daß bei einigen Tieren (E 1, E 8, Tabelle 1) keine fluoreszierenden Glomerula gefunden werden konnten, obwohl sie die gleiche Menge Nephrotoxin erhalten hatten wie andere Ratten (E 3, E 5, E 9, Tabelle 1) mit deutlicher bzw. ausgezeichneter Fluoreszenz der Glomerulumschlingen. Ähnliche Beobachtungen machten wir bei einigen A-Tieren der Parabiosen. Es ist also wichtig zu wissen, daß auch Ratten mit einer Nephrotoxinnephritis fluoreszenzmikroskopisch negativ sein können, d.h. in einigen Fällen injiziertes Kaninchen-Anti-Rattennieren-Globulin in der Niere der Ratte nicht dargestellt werden kann, obgleich es mengenmäßig im Bereich der Nachweisbarkeit liegt und zu histologisch erkennbaren entzündlichen Nierenveränderungen geführt hat.

Die negativen fluoreszenzmikroskopischen Befunde an den B-Tieren der II. Gruppe, Tabelle 2 - Intervall zwischen Injektion des Nephrotoxins (0,8 ml) in das A-Tier und Parabioseoperation 31 bis 33 Tage - lagen im Bereich des Möglichen, da Ditschuneit und Mitarbeiter (6) und Pfeiffer und Mitarbeiter (5) bei Injektion von 0,8 ml Kaninchen-Antiserum bereits nach 10 Tagen nur noch minimale Reste von zirkulierendem Kaninchen - γ - Globulin nachweisen konnten. Nach 33 Tagen ist also bei dieser Dosis praktisch kein Nephrotoxin mehr vorhanden, das in das B-Tier übertreten könnte. Dagegen soll normales Kaninchenserum nach Pfeiffer und Mitarbeitern (5) langsamer aus der Zirkulation verschwinden. Schiller und Mitarbeiter (38), Coons und Mitarbeiter (22,26) und Haurowitz (39) allerdings geben als Zeitspanne für die Elimination von Fremdeiweiß (ohne spezifische Antikörper) aus dem Blut des Empfängertieres nur wenige Tage an.

Die A-Tiere der IV. Gruppe, Tabelle 2 hatten sehr große Dosen (4 ml) Nephrotoxin erhalten. Trotzdem war wahrscheinlich auch hier zum Zeitpunkt der Operation nach 42 und 53 Tagen - bzw. zum Zeitpunkt des Funktionierens der Kapillarbrücke 4 Tage später - nicht mehr genügend Kaninchen-Anti-Rattennieren-Serum im zirkulierenden Blut des primär kranken Tieres vorhanden, um in das

gesunde Tier zu gelangen und sich hier in den Glomerulumschlingen niederzuschlagen.

Von entscheidender Bedeutung sind deshalb die Ergebnisse der I. und III. Gruppe, bei denen die Intervalle zwischen Nephrotoxininjektion in das A-Tier und der parabiotischen Vereinigung so kurz (4 - 7 Tage) gehalten wurden, daß ein Übertritt von Kaninchen-Antikörpern in den gesunden Partner theoretisch möglich schien. Wie in Gruppe II und IV waren auch hier die Nieren des primär gesunden Parabionten im Sinne einer Glomerulonephritis verändert, es konnten jedoch keine Kaninchen-Globuline gegen Rattennieren nachgewiesen werden.

Diese Befunde werfen die Frage auf, ob die Methode nicht empfindlich genug ist, um geringe Mengen des Kaninchen-Antiserums in der Niere des primär gesunden Tieres darzustellen. Pressman (29) fand, daß mindestens 0,4 mg Kaninchen-Anti-Rattennieren-Globuline injiziert werden müssen, um in den Glomerula der Ratte eine Konzentration von $1,4 \times 10^{-4} \text{ g/mm}^2$ - die zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis erforderliche Mindestmenge - zu erreichen. Bei Injektion von 0,4 mg Globulin (diese Menge entspricht ungefähr 0,016 ml Kaninchenserum) konnte Pressman mäßige, bei 0,8 mg und 1,6 mg stärkere und bei 4 mg und 12 mg starke Fluoreszenz feststellen.

Wir können über die Mindestmenge zu injizierender Kaninchenglobuline, die für ein Wiederauffinden mit fluoreszierendem Antikörper erforderlich ist, keine definitiven Aussagen machen. Da einige unserer Ratten, die 0,8 ml Kaninchen-Antiserum (entspricht ungefähr 19,4 mg Globulin) erhalten hatten, schwache Fluoreszenz zeigten und bei kleineren Mengen negative Befunde auftraten, nahmen wir an, die kleinste Dosis erreicht zu haben. Bei unseren Versuchen zur Darstellung von autogenem γ -Globulin injizierten wir unsern Ratten nur 0,6 ml Immuns serum (entspricht ungefähr 14 mg Globulin), das von anderen Kaninchen stammte und bekamen ausgezeichnete Fluoreszenz (siehe Tabelle 3). Da wir demnach bei ähnlichen Dosen wie Pressman ein starkes Aufleuchten der Glomerula beobachteten (Pressman bei 12 mg, unser Wert 14 mg), werden wir in weiteren Versuchen wahrscheinlich den gleichen unteren Grenzwert von 0,4 mg Globulin erreichen können wie dieser

Autor. Aus den exakten quantitativen Untersuchungen von Pressman resultiert, daß die Konzentration von Kaninchen-Antikörpern in den Nieren des primär gesunden Parabionten unterhalb der fluoreszenzoptisch nachweisbaren Mindestmenge liegen muß, wenn weniger als 0,4 mg nephrotoxisches Kaninchenglobulin (etwa 0,01 ml Antiserum) über die Kapillarbrücke in die Zirkulation dieses Tieres gelangen.

In diesem Zusammenhang gewinnt die III. Gruppe besondere Bedeutung. Hier mußte sich wegen der großen Menge injizierten Nephrotoxins (4 ml) und dem kurzen Intervall zwischen Injektion und Parabiose (5-7 Tage, Tabelle 2) zu dem Zeitpunkt, da beide Parabionten einen gemeinsamen Blutkreislauf hatten, noch genügend Kaninchenglobulin in der Zirkulation des nephritischen Tieres befinden, um sich in den Nieren des primär gesunden Partners niederzuschlagen. Allerdings war es notwendig, daß die im Blut kreisenden Globuline noch Antikörperglobuline enthielten. Auch die B-Tiere dieser Gruppe sind negativ. Daraus folgt, daß das Fehlen spezifischer Fluoreszenz in den Basalmembranen der Glomerula aller B-Tiere wahrscheinlich nicht auf die Unempfindlichkeit der Methode zurückzuführen ist. Es ist viel wahrscheinlicher, daß es sich bei den 10 Tage post injectionem zirkulierenden Resten von Kaninchenglobulinen nicht um die Antikörperglobuline handelt, diese dagegen sehr schnell absorbiert und damit aus dem Kreislauf eliminiert werden (Pfeiffer und Mitarbeiter, 5; Ditschuneit und Mitarbeiter, 6). Die sofortige Fixation von nephritiserzeugenden Antikörpern in Minuten bis Stunden wurde mehrfach beschrieben (Sarre und Wirtz 40, 41) Pressman und Mitarbeiter, 42; Rother, 43; Pfeiffer und Mitarbeiter 33,44; Stavitsky und Mitarbeiter, 45).

Damit ist eine Beteiligung der Kaninchen-Antikörper-Globuline an der Entstehung der Glomerulonephritis im primär gesunden Parabionten nicht sehr wahrscheinlich. Allerdings erscheint es unbedingt notwendig, diese Ergebnisse durch Markierung der Kaninchen-Antikörper-Globuline mit radioaktivem Jod oder Schwefel zu bestätigen. Das Verfahren ist nach Pressman (29) 20 000mal genauer als die Fluoreszenzmethode.

In unsern Präparaten fand sich eine relativ starke unspezifische Fluoreszenz (=Fluoreszenz in Abwesenheit einer spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion) der Tubuli und Gefäßendothelien. Durch Kontrollen, besonders durch vorheriges Blockieren der

Antigenorte und damit der spezifischen Fluoreszenz, war die Erkennung der unspezifischen Fluoreszenz immer möglich.

Hill und Cruickshank (46) fanden bei ihren Untersuchungen an dem Organantigen Niere, daß die Antikörper-Globuline des Kaninchenserums, die sie mit Fluoreszein markierten und in vitro auf Nierenschnitte einwirken ließen, nicht nur mit den Basalmembranen der Glomerula, sondern auch mit den Basalmembranen der Tubuli und dem Cytoplasma der Tubulusepithelien reagierten. Mellors und Mitarbeiter (36, 47), die die Rattennieren-Antikörper vom Kaninchen in vivo lokalisieren lassen und nachträglich mit einem markierten Antikörper aufsuchen, konnten mit ihrer Technik eindeutig nachweisen, daß sich die injizierten Antikörper nicht mit den tubulären Antigenen, sondern nur mit den Basalmembranen der Glomerula verbinden. Auch Pressman und Mitarbeiter (42,48,49) beobachteten eine spezifische Lokalisation der mit radioaktivem Jod oder Schwefel markierten Anti-Nieren-Antikörper in den Basalmembranen der Glomerula. Dementsprechend läßt sich die spezifische Fluoreszenz, der eine zweistufige Antigen-Antikörper Reaktion im Glomerulum zugrunde liegt (1. Organantigen Niere + Kaninchen-Antikörper-Globulin, 2. Kaninchen-Antikörperglobulin als Antigen + Schaf-Anti-Kaninchen-Globulin als Anti-Antikörper), blockieren, indem man den markierten Anti-Antikörper durch den unmarkierten von seinen Reaktionsorten fernhält. Die unspezifische Fluoreszenz der Tubuli ist nicht unterdrückbar, da hier keine Kaninchen-globuline durch Organantigene fixiert worden sind und folglich keine Antigen-Antikörper Reaktion zwischen ihnen und dem markierten Anti-Antikörper stattfinden bzw. durch Blockieren verhindert werden kann. Eine Ursache der unspezifischen Anfärbung von Geweben durch an Fluoreszein gekoppelte Antikörper ist nicht bekannt.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Verweildauer der Kaninchen-Globuline in der Niere der Ratte machten Ortega und Mellors (36) die interessante Beobachtung, daß ihre Konzentration in den Glomerula mit der Dauer der Erkrankung zuzunehmen scheint, da die Intensität der Fluoreszenz steigt. Eine befriedigende Erklärung für dieses Phänomen läßt sich vorläufig nicht finden. Im Gegensatz dazu berichtet Seegal (50) - allerdings

handelt es sich um Kaninchennephritiden erzeugt mit Laten-Antiserum - daß die Darstellbarkeit der Entenglobuline in der Kaninchenniere mit der Dauer der Erkrankung abnimmt. Nach Seegal sollen die heterologen nephritisserzeugenden Antikörper durch die vom Empfängertier gegen das Fremdeiweiß gebildeten Antikörper abgesättigt werden und deshalb nicht mehr auffindbar sein.

Unsere eigenen Befunde sind nicht einheitlich. In der II. Gruppe der Parabiosen (Tabelle 2), die sich von der I. Gruppe nur durch die längere Dauer der Nephritis in den A-Tieren unterscheidet, fanden wir eine deutlich ausgeprägte Steigerung der Fluoreszenz gegenüber der I. Gruppe. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Mellors. In der IV. Gruppe dagegen, in der die A-Tiere der Einwirkung des Nephrotoxins (4 ml!) ebenfalls länger ausgesetzt waren als in der III. Gruppe, war die Fluoreszenz nur geringgradig. Wir halten es für möglich, daß evtl. ein Vorgang abläuft, wie ihn Seegal beim Kaninchen beschrieben hat. Auffallend sind die Befunde an den Einzeltieren der IV. Gruppe. Das 22 Tage nach Injektion von 4 ml Nephrotoxin getötete Tier zeigte starke Fluoreszenz, während das nach 55 Tagen untersuchte fluoreszenzmikroskopisch negativ war.

Mellors konnte noch 3 Monate post injectionem Kaninchen-Antikörper-Globuline in der Niere der Ratte nachweisen. Wir haben nur bis zu 2 Monaten nach der Injektion untersucht und während dieser Zeit die Kaninchen-Globuline in unterschiedlicher Stärke darstellen können. Dieses lange Verweilen des Nephrotoxins in der Niere der Ratte läßt an die Möglichkeit einer sekundären Freisetzung der Antikörper mit anschließender Fixation in den Nieren des gesunden Partners denken. Dann müßten aber die Antikörper-Globuline im B-Tier nachweisbar sein. Jedes Fremdeiweiß wird vom Empfängertier als Antigen betrachtet (Haurowitz 39), gegen das der tierische Organismus Antikörper bildet. So würde es sich auch bei den freigesetzten Nephrotoxinen um Antigen-Antikörperkomplexe handeln (5), die nicht so leicht darstellbar sind wie freies Antigen (39). Dafür dürften sie als neutralisierte Verbindungen kaum eine Nierenläsion verursachen.

2. Autogenes Ratten- γ -Globulin.

Die Befunde an den A-Tieren - beim Versuch autogenes Ratten

γ -Globulin mit fluoreszierendem Kaninchen-Anti-Rattenglobulin nachzuweisen - decken sich mit Beobachtungen, die von Ortega und Mellors (36) gemacht wurden. Ortega und Mellors fanden in den Glomerula von Ratten, denen sie nephrotoxisches Serum injiziert hatten, schon nach wenigen Tagen autogenes γ -Globulin, zunächst in geringen Mengen und diffus verteilt, dann in der Konzentration ansteigend und zwar an den gleichen Stellen fixiert, an denen Nephrotoxine lokalisiert waren. Daraus folgerten sie, daß die γ -Globuline Antikörper gegen die Kaninchen-Anti-Rattennieren-Antikörper seien und kamen zu dem Schluß, daß auch bei der Ratte die notwendigen Voraussetzungen für den Ablauf des Mechanismus nach Kay gegeben seien. Kay (51) kam aufgrund seiner Versuche zu folgender Hypothese über die Entstehung der Kaninchen-nephritis, die bekanntlich mit einer Latenzzeit von einigen Tagen einsetzt: Die im Nephrotoxin enthaltenen spezifischen Antikörper gegen Niere werden sofort gebunden. Das restliche nicht fixierte Serum kreist in der Blutbahn und regt als Fremdeiweiß zur Antikörperbildung an. Diese Antikörper entstehen nach 4-6 Tagen, reagieren mit dem in der Niere gebundenen Nephrotoxin und verursachen die Erkrankung. Für die menschliche Nephritis wird ein ähnlicher Vorgang angenommen, an die Stelle des Nephrotoxins tritt hier wahrscheinlich ein Fremdeiweiß oder ein Auto-Antikörper. Mellors und Ortega (52) gelang es, bei der menschlichen Glomerulonephritis und bei der Lipoidnephrose in der Niere γ -Globuline nachzuweisen.

Seegal (51) konnte die Kay'sche Theorie mit fluoreszierenden Antikörpern bestätigen. Sie stellte zunächst die Nephrotoxine in der Niere des Kaninchens dar. Nach einigen Tagen wird die Fluoreszenz schwächer und verschwindet nach 14 Tagen fast ganz. An ihre Stelle tritt (mit einem andern markierten Antikörper nachgewiesen) die Fluoreszenz der autogenen γ -Globuline des Kaninchens. Daraus ergibt sich ein gewisser Gegensatz zu der Mellors'schen Beobachtung, der schon in Abschnitt 1 der Diskussion erwähnt wurde. Während bei Seegal die Nephrotoxine durch die autogenen Gamma-Globuline "zugedeckt" werden und von dem fluoreszierendem Antikörper nicht mehr auffindbar sind, nimmt nach Mellors die Darstellbarkeit der Nephrotoxine mit der Zeit zu, obwohl er in der Niere ebenfalls autogenes γ -Globulin in

steigender Konzentration nachweist, das die Nephrotoxine absättigen könnte. Allerdings benutzt Seegal Kaninchen als Versuchstiere und Mellors Ratten. Bei der Ratte beginnt die Nephritis schon wenige Stunden nach der Injektion des Nephrotoxins, beim Kaninchen erst 7 Tage später (Pfeiffer und Mitarbeiter 44). Pressman und Mitarbeiter (53) geben dazu eine interessante Erklärung. Für die Nierenschädigung ist Komplement erforderlich. Kaninchen-Antikörper können Komplement binden, Enten-Antikörper nicht. Deshalb tritt bei Verwendung von Kaninchen-Antikörpern eine sofortige Zellschädigung ein, mit Enten-Antikörpern dagegen erst dann, wenn die vom Empfängertier gebildeten Antikörper mit dem injizierten Fremdeiweiß reagieren. Das unterschiedliche Verhalten der Nephrotoxine bei Kaninchen und Ratte hinsichtlich ihrer fluoreszenzmikroskopischen Darstellbarkeit bleibt unklar.

Es war uns nicht gelungen, in den primär gesunden Parabionten autogenes γ -Globulin nachzuweisen. Diese Ergebnisse müssen in weiteren Versuchen bestätigt werden, da sie sich auf drei Tiere, die die Operation lange genug überlebten, beschränken. Außerdem wurden A-Tiere und ein B-Tier einerseits, zwei B-Tiere und die Kontrollen andererseits mit fluoreszierenden Kaninchen-Anti-Ratten-Globulinen behandelt, die zwei verschiedenen Sendungen der *Sylvania Chemical Co* entstammten. Ob evtl. einer der Antikörper inaktiv war, werden neue Untersuchungen zeigen.

Lange (54), der sich - in Kenntnis unserer Versuche - zur gleichen Zeit mit demselben Problem befaßte, konnte in den B-Tieren positive Befunde erheben. Er verwendete ein fluoreszierendes Kaninchen-Anti-Ratten-Gamma-Globulin, während wir nur markiertes Kaninchen-Anti-Ratten-Globulin benutzten. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß die gegensätzlichen Ergebnisse auf diesem Unterschied in der Technik beruhen. Mellors und Ortega (52) konnten in einem ähnlichen Fall - sie hatten Kaninchen gegen menschliche Globuline sensibilisiert und die markierten Antikörper vom Kaninchen zum Nachweis von Gamma-Globulinen in der menschlichen Niere bei Glomerulonephritis verwendet - feststellen, daß die Färbung spezifisch für Gamma-Globuline war. Bei Absorption der gegen Gamma-Globuline gerichteten Komponente des fluoreszierenden Antikörpers mit menschlichem Gamma-Globulin blieb die Färbung aus.

Im Zusammenhang mit unsern negativen Befunden am B-Tier seien Versuche von Pfeiffer (55) erwähnt, in denen gegen Rattenniere gerichtete γ -Globuline im Blut beider Parabionten nachgewiesen werden sollten. Gefrierschnitte normaler Rattennieren wurden mit Serum des A-Tieres, andere mit Serum des B-Tieres überschichtet und anschließend mit fluoreszierendem Kaninchen-Anti-Ratten-Globulin gefärbt. Das Fehlen spezifischer Fluoreszenzerscheinungen machte die Anwesenheit von spezifisch gegen Rattenniere gerichteten γ -Globulinen in der Zirkulation beider Parabionten unwahrscheinlich. Allerdings konnte z.B. Mellors (36) mit dem Serum eines schwer nephritischen Tieres, das er einer gesunden Ratte injizierte, bei dieser keine Nierenveränderungen hervorrufen, obwohl uns diese Übertragung mit Hilfe der kontinuierlichen Vereinigung der Parabiose gelungen ist. Den für die Übertragung verantwortlichen Faktor direkt im Blut nachweisen zu wollen, scheint in jedem Fall schwierig zu sein.

Abschließend ist zu bemerken, daß der Nachweis von autogenem γ -Globulin im B-Tier nicht unbedingt etwas über die Herkunft dieser in der Niere fixierten Globuline aussagen muß. Sie können einerseits aus dem nephritischen Partner stammen, andererseits vom primär gesunden Parabionten gegen seine durch irgendwelche Einflüsse geschädigten Nieren gebildet worden sein. Dadurch verliert dieser Befund etwas an Überzeugungskraft.

Da wir in den entzündlich veränderten Nieren der B-Tiere weder Kaninchen-Antikörper-Globuline noch autogenes γ -Globulin nachweisen konnten, hat die vorliegende Arbeit keine Klärung der Frage nach dem immunologischen Mechanismus der durch Parabiose übertragbaren Masugi-Nephritis auf eine gesunde Ratte gebracht. Sie hat lediglich in den Grenzen der hier verwandten Methode gezeigt, daß die ursprünglich dem Primärtier injizierten Kaninchen-antikörper in den primär gesunden Partner nicht übertreten und damit - auch bei kurzem Intervall - wahrscheinlich nicht für die Übertragung der Nephritis verantwortlich gemacht werden können. Es wäre zu überlegen, ob sich durch Darstellung von Komplement - das sich bekanntlich an Antigen-Antikörper Komplexe anlagert - mit fluoreszierendem Antikomplement (Klein und Burkholder 56,57) ein Unterschied zwischen A-Tier und B-Tier zeigen ließe.

E. ZUSAMMENFASSUNG.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir zunächst 9 Einzeltiere und 15 Parabiosen. Die Einzeltiere und die A-Tiere der Parabiosen (A-Tier = primär nephritisches Tier; B-Tier = primär gesundes Tier) wurden in vier Gruppen unterteilt, mit unterschiedlichen Dosen Nephrotoxin behandelt und verschieden lange der Nephrotoxinwirkung ausgesetzt. Anschließend versuchten wir, die injizierten Anti-Rattennieren-Antikörper vom Kaninchen mit fluoreszierenden Schaf-Anti-Kaninchen-Globulinen in den Nieren der Einzeltiere und beider Parabionten darzustellen, da auch die B-Tiere wie Einzeltiere und A-Tiere Veränderungen an den Nieren im Sinne einer Glomerulonephritis aufwiesen. A-Tiere und Einzeltiere sämtlicher Gruppen zeigten spezifische Fluoreszenz der Basalmembranen der Glomerula, abhängig von der Menge des injizierten nephritischerzeugenden Serums und der Dauer der Einwirkung. Bei den B-Tieren waren keine Kaninchen-Antikörper-Globuline nachweisbar, d.h. es konnte keine spezifische Fluoreszenz der Glomerula festgestellt werden. Damit ist - in den Grenzen der verwandten Methode - eine Beteiligung der dem Primärtier (A-Tier) injizierten Nephrotoxine an der Entstehung der Nephritis im primär gesunden Partner (B-Tier) unwahrscheinlich.

Weiterhin wurden die Nieren von 3 Parabiosepaaren, deren A-Tiere 0,6 ml Nephrotoxin erhalten hatten, mit fluoreszierenden Kaninchen-Anti-Ratten-Globulinen auf die Anwesenheit von autogenen γ -Globulinen untersucht. In den A-Tieren ließen sich in den Basalmembranen der Glomerulumschlingen Ratten-Globuline nachweisen. In den B-Tieren waren weder Nephrotoxine vom Kaninchen noch autogene γ -Globuline aufzufinden. Somit bleibt der Faktor, der die experimentelle Glomerulonephritis im Parabioseversuch auf den gesunden Parabionten überträgt, weiter im Dunkeln.

Für Überlassung des Themas, gleichzeitig für Rat, Hilfe und Anregung bei der Durchführung der Arbeit bin Herrn Prof. Dr. med. E. F. Pfeiffer von der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. med. K. Federlin von der gleichen Klinik sei für seine Hilfe bei den histologischen Untersuchungen gedankt.

Herrn Dr. Albert H. Coons, Assoc. Prof., Dept. of Bacteriology and Immunology, Havard Medical School, Boston, Mass. danke ich für seine uns anlässlich eines Besuches in Frankfurt übermittelten Erfahrungen mit der Fluoreszenztechnik.

Herrn Prof. Dr. med. W. Krücke, Direktor des Neurologischen Institutes der Universität Frankfurt am Main gilt unser besonderer Dank für den freundlicherweise zur Verfügung gestellten Kryostaten.

LITERATURVERZEICHNIS.

1. Pfeiffer, E.F., Schöffling, K., Sandritter, W., Schröder, J., Steigerwald, H. und Wolf, L.: Studien zur "Übertragung" der Masugi-Nephritis der Ratte: I. Die "Übertragung" durch kurz-dauernde Parabiose. Z.ges.exp.Med. 124, 471 (1954)
2. Pfeiffer, E.F., Sandritter, W., Menk, W., Schöffling, K., Kraus, E. und Treser, G.: Weitere Untersuchungen zur Übertragung der experimentellen Glomerulonephritis der Ratte mit Hilfe des Parabioseversuches. Klin.Wschr. 9, 524 (1959)
3. Pfeiffer, E.F., Sandritter, W., Schöffling, K., Treser, G., Kraus, E., Menk, W. und Herrmann, M.: Studien zur "Übertragung" der Masuginephritis der Ratte. II. Die Übertragung durch Parabiose genetisch gleichartiger Partner. Z.ges.exp.Med. 132, 436 (1960)
4. Sandritter, W., Kraus, E., Treser, G., Menk, W., Herrmann, M., Schöffling, K. und Pfeiffer, E.F.: Studien zur "Übertragung" der Masuginephritis der Ratte. III. Die Übertragung der "chronischen" Glomerulonephritis durch Parabiose genetisch gleichartiger Partner. Z.ges.exp.Med. 132, 453 (1960)
5. Pfeiffer, E.F., Ditschuneit, H., Federlin, K., Mosler, I., Ohebschalon, R. und Sandritter, W.: Immunelektrophoretische und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an der durch Parabiose übertragenen experimentellen Glomerulonephritis der Ratte. Klin.Wschr. 12, 611 (1960)
6. Ditschuneit, H., Ohebschalon, R. und Pfeiffer, E.F.: Studien zur "Übertragung" der Masuginephritis der Ratte. V. Die Kinetik der Elimination von Kaninchen-Anti-Rattennierenglobulin, Kaninchen- γ -Globulin, Humanalbumin und Human- γ -Globulin bei der Ratte. Z.ges.exp.Med. 134, 148 (1961)
7. Obermayer, F. und Pick, E.P.: Über die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweißkörper. Wien.Klin.Wschr. 19, 327 (1906)
8. Landsteiner, K. und Lampl, H.: Über die Abhängigkeit der serologischen Spezifität von der chemischen Struktur. Biochem. Zschr. 86, 343 (1918)

9. Haurowitz, F. und Breinl, F.: Quantitative Untersuchung der Verteilung eines arsenhaltigen Antigens im Organismus. Z.phys. Chemie 205, 259 (1932)
10. Marrack, J. und Smith, F.C.: Quantitative Aspects in Immunity Reactions: The Composition of the Precipitate in Precipitin Reactions. Brit.J.Exp.Path. 12, 182 (1931)
11. Heidelberger, M., Kendall, F.E. und Soo Hoo, C.M.: Quantitative Studies on the Precipitin Reaction. Antibody Production in Rabbits injected with Azo-Protein. J.exp.Med. 58, 137 (1933)
12. Sabin, F.R.: Cellular Reactions to a Dye-Protein with a Conception of the Mechanism of Antibody Formation. J.exp.Med. 70, 67 (1939)
13. Reiner, L.: On the Chemical Alterations of Purified Antibody-Proteins. Science 72, 483 (1930)
14. Bronfenbrenner, J., Hetler, D.M. und Eagle, I.O.: Modification of Therapeutic Sera with a View of avoiding Complications of Allergic Nature. Science 73, 455 (1931)
15. Marrack, J.: Nature of Antibodies. Nature 133, 291 (1934)
16. Eagle, H., Smith, D.E. und Vickers, P.: The Effect of Combination with Diazo Compounds on the Immunological Reactivity of Antibodies. J.exp.Med. 63, 617 (1936)
17. Coons, A.H., Creech, H.J. und Jones, R.N.: Immunological Properties of an Antibody containing a Fluorescent Group. Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 47, 200 (1941)
18. Fieser, L.F. und Creech, H.J.: The Conjugation of Amino Acids with Isocyanates of the Anthracene and 1,2 Benzanthracene Series. J.Amer.Chem.Soc. 61, 3503 (1939)
19. Creech, H.J. und Jones, R.N.: The Conjugation of Horse Serum Albumin with 1,2 Benzanthrlyl-Isocyanate. J.Amer.Chem.Soc. 62, 1970 (1940)
20. Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. und Berliner, E.: The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. J. Immunol. 45, 159 (1942)

21. Coons, A.H. und Kaplan, M.H.: Localization of Antigen in Tissue Cells. II. Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody. *J.exp.Med.* 91, 1 (1950)
22. Coons, A.H., Leduc, E.H. und Kaplan, M.H.: Localization of Antigen in Tissue Cells. VI. The Fate of Injected Foreign Proteins in the Mouse. *J.exp.Med.* 93, 173 (1951)
23. Hamperl, H.: Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. *Virch.Arch.path.Anat.* 292, 1 (1934)
24. Coons, A.H., Leduc, E.H. und Connolly, J.M.: Immunohistochemical Studies of Antibody Response in the Rabbit. *Fed.Proc.* 12, 439 (1953)
25. Coons, A.H., Leduc, E.H. und Connolly, J.M.: Studies on Antibody Production. I. A method for the Histochemical Demonstration of Specific Antibody and its Application to a Study of the Hyperimmune Rabbit. *J.exp.Med.* 102, 49 (1955)
26. Coons, A.H.: Histochemistry with Labeled Antibody. International Review of Cytology, Vol 5, p. 1, Academic Press, New York 1956.
27. Weller, T.H. und Coons, A.H.: Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 86, 789 (1954)
28. Mellors, R.C.: Histochemical Demonstration of the IN VIVO Localization of Antibodies: Antigenic Components of the Kidney and the Pathogenesis of Glomerulonephritis. *J.histochem. cytochem.* 3, 284 (1955)
29. Pressman, D., Yagi, Y. und Hiramoto, R.: A Comparison of Fluorescein and I^{131} as Labels for Determining the "in vivo" Localization of Anti-Tissue Antibodies. *Int.Arch.Allergy* 12, 125 (1958)
30. Masugi, M.: Über das Wesen der spezifischen Veränderungen der Niere und der Leber durch das Nephrotoxin bzw. Hepato-toxin. Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese der Glomerulonephritis und der ekklamptischen Lebererkrankungen. *Beitr. path.Anat.* 91, 82 (1933)

31. Masugi, M.: Über die experimentelle Glomerulonephritis durch das spezifische Antinierenserum. Ein Beitrag zur Pathogenese der diffusen Glomerulonephritis. Beitr.path.Anat. 92, 429 (1934)
32. Smadel, J.E.: Experimental Nephritis in Rats induced by Injection of Anti-Kidney Serum. I. Preparation and Immunological Studies of Nephrotoxin. J.exp.Med. 64, 921 (1936)
33. Pfeiffer, E.F., Schöffling, K., Bruch, H.E. und Spielmann, W.: Masugi-Nephritis und Serumkomplement der Ratte. Z.ges.exp. Med. 122, 446 (1954)
34. Böhle, E. und Fischer, H.: Eine Colorimetrische Routinemethode zur Bestimmung kleiner Eiweißmengen in Körperflüssigkeiten und Geweben. Klin.Wschr. 31, 798 (1953)
35. Bunster, E. und Meyer, R.K.: An improved Method of Parabiosis. Anat. Rec. 57, 339 (1933)
36. Ortega, L.G. und Mellors, R.C.: Analytical Pathology. IV. The Role of Localized Antibodies in the Pathogenesis of Nephrotoxic Nephritis in the Rat. J.exp.Med. 104, 151 (1956)
37. Pringsheim, P.: Fluorescence and Phosphorescence. Interscience Publishers, New York, London, 1949
38. Schiller, A.A., Schayer, R.W. und Hess, E.L.: Fluorescein-Conjugated Bovine Albumin. Physical and Biological Properties. J.Gen.Physiol. 36, 489 (1953)
39. Haurowitz, F.: In: Mechanisms of Hypersensitivity. Henry Ford Hosp. Intern. Symp., p.547, Little, Brown & Co., Boston and Toronto, 1959
40. Sarre, H. und Wirtz, H.: Geschwindigkeit und Ort der "Nephrotoxin"-Bindung bei der experimentellen Glomerulonephritis. Klin. Wschr. 18, 1548 (1939)
41. Sarre, H. und Wirtz, H.: Geschwindigkeit und Ort der Antigen-Antikörper Reaktion bei der experimentellen Nephritis. Dtsch. Arch.klin.Med. 189, 1 (1942)
42. Pressman, D., Eisen, H.N. und Fitzgerald, P.J.: The Zone of Localization of Antibodies. VI. The Rate of Localization of Anti-Mouse-Kidney Serum. J.Immunol. 64, 281 (1950)

43. Rother, K.: Über die Pathogenese verschiedener Formen experimenteller Nephritis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. Pharm. 220, 448 (1953)
44. Pfeiffer, E.F., Schöffling, K. und Bruch, H.E.: Serumkomplement und Masugi-Nephritis der Ratte. Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 59, 453 (1953)
45. Stavitsky, A.B., Hackel, D.B. und Heymann, W.: Reduction of Serum Complement following in vivo Tissue Antigen-Antibody Reactions. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 85, 593 (1954)
46. Hill, A.G.S. und Cruickshank, B.: A Study of Antigenic Components of Kidney Tissue. Brit.J.Path. 34, 27 (1953)
47. Mellors, R.C., Siegel, M. und Pressman, D.: Analytic Pathology. Histochemical Demonstration of Antibody Localization in Tissues, with Special Reference to the Antigenic Components of Kidney and Lung. J.Lab. Invest. 4, 69 (1955)
48. Pressman, D., Hill, R.F. und Foote, F.W.: The Zone of Localization of Anti-Mouse-Kidney Serum as Determined by Radioautographs. Science 109, 65 (1949)
49. Pressman, D., Eisen, H.N., Siegel, M., Fitzgerald, P.J., Sherman, B. und Silverstein, A.: The Zone of Localization of Antibodies. X. The Use of Radioactive Sulfur³⁵ as a Label for Anti-Kidney Serum. J.Immunol. 65, 559 (1950)
50. Seegal, B.C.: In Vivo Localization of Specific Antiorgan Sera: Relation to Occurrence of Renal Lesions. In: Mechanisms of Hypersensitivity, Henry Ford Hospital Symp., p.143, Little, Brown & Co., Boston and Toronto, 1959
51. Kay, C.F.: The Mechanism by which Experimental Nephritis is produced in Rabbits injected with Duck Serum. J.Exp.Med. 72, 559 (1940)
52. Mellors, R.C. und Ortega, L.G.: Analytic Pathology. III. New Observations on the Pathogenesis of Glomerulonephritis, Lipoid Nephrosis, Periarteriitis Nodosa, and Secondary Amyloidosis in Man. Am.J.Path. 32, 455 (1956)

53. Pressman, D., Korngold, L. und Heymann, W.: Localizing Properties of Anti-Rat-Kidney Serum Prepared in Ducks. Arch. Path. (Chicago) 55, 347 (1953)
54. Lange, K.: Mündliche Mitteilung
55. Pfeiffer, E.F.: Persönliche Mitteilung
56. Klein, P. und Burkholder, P.: Die Darstellung von fixiertem Komplement mit markiertem Antikomplement. Schweiz.Z.Path. Bakt. 22, 729 (1959)
57. Klein, P. und Burkholder, P.: Ein Verfahren zur fluoreszenz-optischen Darstellung der Komplementbindung und seine Anwendung zur histo-immunologischen Untersuchung der experimentellen Nierenanaphylaxie. Dtsch.Med.Wschr. 45, 2001 (1959)

LEBENS LAUF.

Am 6. 3. 1930 wurde ich als viertes Kind des Polizeimeisters Wilhelm Mosler und dessen Ehefrau Emma, geb. Weidlich, in Beuthen/Oberschlesien geboren.

Ich besuchte von 1936 bis 1941 die Volksschule in Karf, Kreis Beuthen, von 1941 bis Januar 1945 die Mittelschule in Beuthen und nach der Vertreibung aus Oberschlesien von November 1945 bis Juli 1950 die Mädchenoberrealschule der Englischen Fräulein in Aschaffenburg, die ich mit dem Abitur abschloß.

Von 1950 bis 1953 arbeitete ich zunächst als Sekretärin, da mein Vater in Bayern wegen seines Alters nicht eingestellt worden war und kaum etwas verdiente.

Im November 1953 begann ich das Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, das ich aus finanziellen Gründen mehrmals unterbrechen mußte, bis ich nach dem Physikum ein Stipendium erhielt. Ich legte die ärztliche Prüfung im August 1961 in Frankfurt am Main ab.

